

0-775218

На правах рукописи



Емельянова Елена Константиновна

**МИКРООРГАНИЗМЫ ПРИРОДНЫХ БИОЦЕНОЗОВ ДЛЯ
БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ И ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ СИБИРИ,
ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ**

03.00.23 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2009

Работа выполнена в ФГУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Минздравсоцразвития России.

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук Репин Владимир Евгеньевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Теплякова Тамара Владимировна
доктор биологических наук, профессор Дейнеко Елена Викторовна

Ведущая организация:

Институт систематики и экологии животных СО РАН

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000515074

Защита состоится «5» марта 2009 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д.208.020.01 при ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора Минздравсоцразвития России по адресу: ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово Новосибирской области, 630559; тел. (383) 336-74-28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Автореферат разослан «4» 02 2009 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Л. И. Карпенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Загрязнение нефтью представляет большую опасность для окружающей среды. Биоремедиация в местах утечек нефти является одним из важнейших природоохранных мероприятий, направленных на восстановление биогеоценозов загрязненных земель и водоемов.

Проблема загрязнения окружающей среды нефтью особенно актуальна для Сибири, где располагается основной нефтегазоносный район России (территория Ханты-Мансийского автономного округа). Негативное влияние нефти распространяется на все составляющие экосистем Севера: ухудшается качество гумусового слоя, нарушаются аэрация, гидрологический режим и микрорельеф верхних горизонтов почвы, разрушаются устоявшиеся трофические цепи и, как следствие, увеличиваются техногенные площади, изменяется биологическое разнообразие природных ландшафтов.

Для уязвимых северных экосистем со специфическими природно-климатическими условиями (длительный период с отрицательными температурами воздуха, наличие многолетнемерзлых пород), где самоочищение происходит медленно, необходимость биоремедиации не вызывает сомнений. Легко разрушаемые при техногенном воздействии в результате интенсивного освоения природных ресурсов и медленно восстанавливающиеся природные экосистемы требуют разработки особого подхода к решению экологических проблем.

Нефть представляет собой сложную смесь трудноутилизируемых в природе компонентов. Бактерии, микроскопические низшие водоросли, актиномицеты, грибы, входящие в состав микробоценозов почв и водоемов, являются деструкторами нефтепродуктов. Микроорганизмы способны подвергать разрушению углеводороды избирательно в следующей убывающей последовательности: n-алканы – разветвленные алканы – изопреноидные алканы – ароматические углеводороды – циклические углеводороды (Cohen, 2002).

В связи с тем, что биологическая деградация нефти в окружающей среде начинается микроорганизмами-деструкторами, важно, чтобы их численность была высокой (особенно на начальном этапе восстановления экосистемы). Это не всегда возможно, поскольку микробоценоз страдает от токсического шока, вызываемого поступлением больших количеств нефти в случае разлива, и численность

микроорганизмов сокращается. Внесение дополнительных количеств эффективных микроорганизмов-деструкторов (биодеструкторов) позволяет усилить и ускорить разрушение нефти. Для условий севера оптимальным является внесение психротолерантных микроорганизмов, способных функционировать при пониженных температурах. Одним из эффективных приемов биоремедиации в условиях Сибири является сочетание использования штаммов-деструкторов, природных сорбентов, высева травянистых растений. Эти технологии очистки от нефтепродуктов являются перспективными, поскольку позволяют без значительного ущерба для природы восстановить экосистемы.

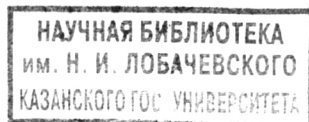
Цель исследования. Целью исследования являлось выделение психротолерантных микроорганизмов-нефтедеструкторов и создание ассоциаций, способных эффективно деградировать нефть и нефтепродукты в климатических условиях Сибири с перспективой их использования для биоремедиации.

Основные задачи исследования:

1. выделение и идентификация штаммов микроорганизмов, утилизирующих нефть;
2. оценка степени биodeградации n-алканов и ароматических углеводородов микроорганизмами-деструкторами, выделенными из природных биоценозов;
3. создание ассоциаций штаммов микроорганизмов, включающих разные таксономические группы, способных к эффективной утилизации нефти;
4. оценка роста и развития растений в очищенной биодеструкторами почве.

Научная новизна работы. Выделены и идентифицированы новые штаммы микроорганизмов, обладающие высокоэффективной нефтеутилизирующей активностью, адаптированные к климатическим условиям Сибири, способные к росту в широком диапазоне pH и содержания NaCl. Создана ассоциация штаммов микроорганизмов, включающая бактерии и дрожжи. Определена степень утилизации углеводородов нефти Западной Сибири и республики Коми штаммами выделенных микроорганизмов.

Практическая значимость. Полученные штаммы микроорганизмов, часть из которых защищена патентами (№ 2272071, № 2271390), предложены для использования с целью биоремедиации окружающей среды (почв, водоемов), очистки нефтезагрязненных промышленных объектов в условиях северного климата.



Положения, выносимые на защиту:

1. бактериальные штаммы *Acinetobacter junii* El 133, *Acinetobacter calcoaceticus* El 134, *Acinetobacter calcoaceticus* El 135, выделенные из антропогенно загрязненной реки, *Enterobacter sp.* В 1024, выделенный из эвтрофного озера, дрожжи *Yarrowia lipolytica* Y 1064, выделенные из реликтового торфа, являются эффективными биодеструкторами нефти, утилизирующими до 97% n-алканов и до 53,5% ароматических компонентов нефти.
2. обработка нефтезагрязненных сред ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* В 1024, штаммами *Acinetobacter* способствует ускорению деструкции нефти.
3. утилизация нефти происходит с большей эффективностью в ассоциации *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* В 1024 по сравнению с применением монокультуры штамма *Yarrowia lipolytica* Y 1064.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на международных и межрегиональных конференциях, конгрессах и симпозиумах «Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды» (Саратов, 2005), «Фундаментальные проблемы изучения и использования воды и водных ресурсов» (Иркутск, 2005), «Экватэк-2004» (Москва, 2004), «Добыча, подготовка, транспорт нефти и газа» (Томск, 2004), «Наука и Бизнес. Поиск и использование новых биомолекул: биоразнообразие, окружающая среда, биомедицина» (Пушино, 2004), «Прогрессивные научные технологии для здоровья человека» (Кара-Даг, Украина, 2003), «Innovate roles of biological resource centers» (Tsukuba, Japan, 2004), «Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование» (Иркутск, 2004), «Современные проблемы геохимической экологии и сохранения биоразнообразия» (Бишкек, Киргизия, 2003), «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водоемов» (Иркутск, 2003), «Проблемы биоремедиации в XXI веке» (Красноярск, 2002).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 3 статьи.

Личный вклад. Автору принадлежат постановка задач, выделение природных изолятов микроорганизмов из различных биоценозов, их идентификация, выявление биохимических и физиологических свойств, выделение ДНК, амплификация, оценка нефтеутилизирующей активности, создание ассоциаций штаммов микроорганизмов, постановка и осуществление опытов с растениями. Исследование степени деструкции компонентов нефти газохроматографическими методами проведены на базе ФГУН

ГНЦ ВБ «Вектор» зав. химико-аналитической лабораторией С. Е. Олькиным, в ЗАО Институте хроматографии «ЭкоНова» Л. А. Кожановой, в институте органической химии им. Н. Н. Ворожцова совместно с к.б.н. С. В. Морозовым, во ФГУП СНИИГГиМС совместно с В. Н. Меленевским, в институте химии нефти (Томск) совместно с к.б.н. Л. И. Сваровской. Выделение плазмид и электрофорез проведен к.б.н. Л. И. Пучковой. Атомно-силовая микроскопия осуществлена к.б.н. Б. Н. Зайцевым. Определение жирнокислотного профиля микроорганизмов и работа с системой «Biolog» проведена совместно с Т. Торок в Национальной лаборатории Лоуренса (Беркли, США).

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы из 236 наименований, в т.ч. 85 на иностранном языке, приложения. Работа изложена на 143 листах машинописного текста и содержит 16 таблиц и 21 рисунок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы рассмотрено влияние нефти на окружающую среду в условиях северного климата, описаны особенности трансформации нефти в почве, способы и определяющие факторы биоремедиации. Обобщены данные о влиянии нефти на почвенные ферменты. Рассмотрены изменения в составе гумуса почвы в результате загрязнения нефтепродуктами. Особое внимание уделяется значению микроорганизмов в утилизации нефти и ее компонентов. Отмечена роль плазмид бактерий в биodeградации компонентов нефти. Проведен анализ опубликованных материалов о коммерческих препаратах на основе микроорганизмов и сорбентов для очистки почвы и водных объектов от нефтепродуктов.

Глава 2. Объекты и методы исследования

Отбор образцов грунтов, воды, донных отложений осуществляли из загрязненных объектов в районе месторождений нефти в ХМАО, ЯНАО, реликтового торфа Васюганской низменности (ХМАО), почвы прибрежной зоны реки Катунь (Горный Алтай), почвы зоны вечной мерзлоты Якутии, ила эвтрофного озера Кротовая Ляга (Новосибирская область), ила и воды антропогенно загрязненных рек Новосибирской области: Ельцовки-1, Койнихи, Власихи, Чика, Издревой.

Выделение микроорганизмов-деструкторов нефти проводили после инкубирования образцов природных субстратов (воды, почвы, донных отложений, загрязненных грунтов) в жидкой питательной среде 8Е (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1.5; KH_2PO_4 – 0.7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.8; NaCl – 0.5; pH 7.2 с добавлением нефтепродукта до 2 % на качалке при различных температурах; затем полученные накопительные культуры переносили на агаризованную среду 8Е для получения чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов.

Изучение морфологических признаков живых и окрашенных клеток полученных изолятов-деструкторов проводили с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия), а также с помощью атомно-силового микроскопа.

Биохимические и физиологические свойства штаммов микроорганизмов изучали с помощью системы «OmniLog» («Biolog», США), а также стандартными методами в соответствии с «Методами общей бактериологии» (Герхардт, 1983).

Идентификацию штаммов осуществляли методами анализа жирных кислот, системой “MicroLog”, сравнением нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР, соответствующих фрагментам гена 16S рРНК.

Жирнокислотный профиль определяли с помощью газового хроматографа Agilent Technologies (Palo Alto, США) Model 6890. Хроматограммы анализировали системой Sherlock Microbial Identification System Version 4.5 (MIDI, США).

Выделение ДНК из клеток проводили с помощью реагентов «Qiagen», США согласно их рекомендациям (Qiagen Genomic..., 2001). Амплификацию ДНК проводили на приборе “Applied biosystems 16 capillary 3100 Genetic Analyzer systems”. Цикл включал 25 реакций по следующей программе: 96° С в течение 10 с, 50° С в течение 5 с, 60° С в течение 4 мин.

Для проведения ПЦР-реакции использовали 1.5 μl ДНК, 2 μl 27 F праймера (5' –AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 2 μl 1492 R праймера (5' –TACGGYTACCTTGTTACGACT 3'), 44.5 μl смеси ферментов, буфера, нуклеотидов (общий объем 50 μl). Полученную последовательность нуклеотидов сравнивали с базой данных NCBI, по результатам сравнения идентифицировали штаммы.

Предварительную оценку непатогенности штаммов-деструкторов проводили косвенным образом при исследовании гемолитических, плазмокоагулазных и фибринолитических свойств.

Чувствительность к антибиотикам у выделенных бактерий определяли методом бумажных дисков на среде РПА (Лебедева, 1973).

Выделение плазмидных ДНК проводили методом щелочного лизиса (Манниатис и др, 1984). Полученную ДНК анализировали в 0.8%-ом агарозном геле в трис-боратном буфере, pH 8.0.

Первичную оценку нефтеутилизирующей активности штаммов производили по следующим параметрам: характеру и скорости биоэмульгации нефти, увеличению оптической плотности культуральной жидкости, наличию газообразования.

Экстрагирование остаточной нефти проводили хлороформом трехкратно.

Для определения содержания углеводов нефти использовали методы капиллярной газовой хроматографии, жидкостной хроматографии и хроматомасс-спектрометрии. Хроматографический анализ выполняли на приборах модели 3600 ("VARIAN Associates", Inc., США), оснащенном колонкой J&W Scientific DB-5, 30 м х 0.22 мм, инжектором с делением потока, пламенно-ионизационным детектором, системой регистрации и обработки хроматографических данных (ChromStar, "Bruker", Германия); микроколоночном жидкостном хроматографе «Милюхром А-02» с УФ-спектрофотометрическим детектором; хроматомасс-спектрометре с использованием кварцевой капиллярной колонки 30 м · 0.32 мм с неподвижной хроматографической фазой DB-5.

Отнесение хроматографических пиков на хроматограммах экстрактов выполняли по времени удерживания с использованием калибровочного образца (Boiling Point Calibration Sample #1, "ULTRA Scientific, Inc.", США). Величину утилизации углеводов (в процентах) определяли как разность площадей его пиков на хроматограммах экстрактов проб без добавления деструкторов (контроль) и после деструкции (Colombo, et al., 1996; Palittapongarnpim et al., 1998; Chaineau et al., 2003).

Статистическую обработку экспериментальных данных при измерениях параметров роста растений выполняли стандартными методами (Гранатовский, Сирая, 1990).

Глава 3. Результаты и обсуждение

Выделение и идентификация штаммов микроорганизмов

На основе выделенных из селективной среды с нефтью микробных изолятов создана коллекция из 424 штаммов, включающая бактерии (представители родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* и др.), дрожжи (*Yarrowia sp.*, *Saccharomyces sp.* и др.) и

несовершенные грибы (*Penicillium*, *Aspergillus* и др.). Эффективными деструкторами нефти оказались природные изоляты из грунтов Спорышевского месторождения *Arthrobacter* sp. Nb 16, Западно-Салымского месторождения - *Pseudomonas* ND 4, *Saccharomyces* sp. NR 3-2, из торфа Васюганской низменности - микромицет NF 2-2, из берегового грунта Горного Алтая - *Acinetobacter* sp. Alt 221, *Acinetobacter* sp. Alt 222, бактериальные изоляты из Якутии Ja 285, *Arthrobacter* sp. Ja 269 и др.

Идентификация некоторых штаммов современными методами (табл. 1) была произведена после газохроматографических исследований и подтверждения высокой нефтеутилизующей активности.

Таблица 1. Идентификация штаммов-деструкторов разными методами

Штамм	Метод анализа жирных кислот	Индекс сходства	MicroLog system	Индекс сходства	По результатам данных о нуклеотидной структуре участка гена 16S PHK	Индекс сходства, %
EI 133	<i>Acinetobacter junii</i>	0, 625	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0, 635	<i>Acinetobacter junii</i>	99 %
EI 134	<i>Acinetobacter johnsoni</i>	0, 397	<i>He проводилась</i>	-	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99 %
EI 135	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	0, 394	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0, 284	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99 %
Y 1064	<i>He проводилась</i>	-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0, 969	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99 %
B 1024	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	0, 783	<i>Kluyvera ascorbata</i>	0, 374	<i>Enterobacter</i> sp. B 901-2	100 %

Поскольку результаты идентификации штаммов отличались в разной степени в зависимости от метода, а индексы сходства микроорганизмов, полученные методами жирнокислотного анализа и биохимической системы «MicroLog», были недостаточно высокими, было принято решение руководствоваться результатами секвенирования, где индекс сходства составлял 99-100%. Таким образом, самые эффективные штаммы – утилизаторы нефти были идентифицированы как *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter calcoaceticus* (2 штамма), *Yarrowia lipolytica*, *Enterobacter* sp.

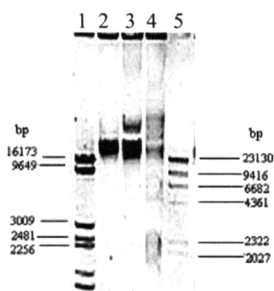
Морфолого-культуральные и физиологические свойства штаммов-деструкторов

Выявлено, что штаммы *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter* sp. B 1024, наиболее перспективные для биотехнологических разработок по

нефтеутилизирующей способности, являются психротолерантными и солеустойчивыми (до 5 % NaCl). Это предполагает возможность их использования в засоленных природных субстратах при пониженных температурах (например, на территории нефтеразлива, где кроме нефти присутствуют минерализованные пластовые воды).

Косвенные признаки патогенности: гемолитические, плазмокоагулязные и фибринолитические свойства у штаммов-деструкторов EI 133, EI 134, EI 135, Y 1064, B 1024 не выявлены.

Скрининг плазмидных ДНК в клетках бактерий *Acinetobacter junii* EI 133, *Acinetobacter calcoaceticus* EI 134 и *Acinetobacter calcoaceticus* EI 135 показал, что штаммы содержат разное количество плазмид, которые отличаются по молекулярному весу (рис. 1).



Размер плазмидных ДНК в штаммах EI 133 и EI 134 составляет более 23000 bp. Штамм *Acinetobacter calcoaceticus* EI 135 содержит набор плазмид, как высоко-, так и низкомолекулярных, что позволяет в природных условиях повысить конкурентноспособность и адаптивность.

Рис. 1. Плазмидные ДНК в клетках штаммов-деструкторов *Acinetobacter* EI 133, EI 134, EI 135.

Обозначения: 1 - BglII+λ, 2 - EI 133; 3 - EI 134; 4 - EI 135; 5 - HindIII+λ ДНК.

Биодеградация нефти бактериальными и дрожжевыми штаммами микроорганизмов

Способность микроорганизмов продуцировать внеклеточные эмульгирующие агенты является ключевой в биодеградации нефти. Выделенные бактериальные штаммы из урбанизированной реки Ельцовки-1 (*Acinetobacter* EI 133, EI 134 и EI 135) и штамм дрожжей из реликтового торфа Васюганской низменности (*Yarrowia lipolytica* Y 1064) обладали уникальной способностью к биоэмульгации нефти.

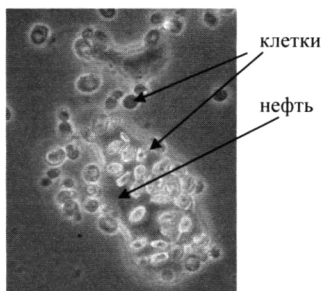


Рис. 2. Клетки дрожжевого штамма *Yarrowia lipolytica* Y 1064 на поверхности нефти (световая микроскопия, x 2500).

Сплошная пленка нефти под действием биоэмульгаторов этих микроорганизмов разбивалась на отдельные сферические конгломераты уже на вторые сутки культивирования. С помощью световой микроскопии было выявлено, что значительная часть бактериальных и дрожжевых клеток биодеструкторов сорбировалась на поверхности микрокапель нефти (рис. 2).

Для ряда штаммов (*Bacillus* sp. 282, *Arthrobacter* sp. 283, *Saccharomyces* sp. NF 4-2 и *Yarrowia lipolytica* Y 1064) степень биодеградациии нефти была выявлена весовым методом (табл. 2).

Таблица 2. Результаты анализа исходной и остаточной после биодеструкции нефти весовым методом

Образец	Исходная навеска, мг	Остаточная нефть, мг	Степень деструкции, %	Групповой состав, мг	
				Углеводороды	Смолы + асфальтены
Контроль	400	400	0	370	30
<i>Bacillus</i> sp. 282	400	126	69	112	14
<i>Arthrobacter</i> sp. 283	400	107	73	91	16
<i>Saccharomyces</i> sp. NF 4-2	400	66	84	55	11
<i>Yarrowia lipolytica</i> Y 1064	400	125	69	105	20

Как видно из табл. 2, исследованные штаммы имели степень деструкции нефти в интервале от 69 до 84 % за 7 сут культивирования в жидкой среде с нефтью при 23-25°C, что является хорошим результатом.

Оценка деструкции н-алканов микроорганизмами

Для выбора оптимального штамма-деструктора и его дальнейшей разработки был проведен газохроматографический анализ остаточной нефти, который показал, что после деструкции в течение 5 суток при температуре 23-25°C штаммом *Yarrowia*

lipolytica Y 1064 произошло уменьшение площади н-алканов с 7.17 до 3.89 по сравнению с контролем, т.е. в 1,84 раза (табл. 3).

Таблица 3. Результаты анализа исходной и остаточной после биодеструкции нефти газохроматографическим методом

Параметры	Штаммы			
	Контроль	<i>Yarrowia lipolytica</i> Y 1064	<i>Bacillus sp.</i> 282	<i>Artrobacter sp.</i> 283
Суммарная площадь н-алканов	7.17	3.89	6.54	6.66
Соотношение Пристан (I-C 19) / Фитан (I-C 20)	0. 93	0. 82	0. 94	1. 17
Соотношение площадей: четные н-алканы / нечетные н-алканы	1. 02	0. 98	1. 05	1. 02
Соотношение н-С17/Пристан	2.72	1.7	2.84	2.21
Соотношение н-С18/Фитан	2.14	1.19	2.12	2.27
Содержание пристана, %	2. 78	4. 69	2. 84	3. 41
Содержание фитана, %	3. 00	5. 67	3. 03	2. 93

Показателями биохимического окисления нефтяных углеводородов являются увеличение содержания пристана и фитана, уменьшение отношения гептадекана к пристану, октадекана к фитану (Петров, 1984). Представленные в табл. 3 данные показывают, что в окисленных нефтяных остатках штаммом *Yarrowia lipolytica* Y 1064 указанные соотношения уменьшаются. Так, соотношение гептадекана к пристану уменьшается с 2,72 до 1,7; соотношение октадекана к фитану уменьшается с 2,14 до 1,19. В остаточной нефти после биодеструкции штаммом *Yarrowia lipolytica* Y 1064 показатель увеличения составляет для пристана в 1,68 раза, для фитана – в 1,89 раза.

В связи с тем, что в состав нефти входит большое количество различных химических соединений, и один штамм не способен обладать всем спектром ферментов, необходимых для биodeградации этих компонентов, представляется необходимым применение ассоциаций штаммов микроорганизмов. Внесение нескольких штаммов в загрязненный субстрат, отличающихся по спектру потребляемых веществ, позволяет утилизировать нефть более продуктивно (Кобзев и др., 2001). В наших исследованиях наиболее эффективно утилизировала компоненты нефти ассоциация, содержащая в своем составе микроорганизмы *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* B 1024 (табл. 4).

Таблица 4. Степень утилизации н-алканов нефти разных месторождений ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* B 1024 в различных условиях эксперимента, выявленная газохроматографическим методом

Месторождение нефти	Условия опыта			Утилизация н-алканов, %
	pH среды	Концентрация соли в среде (NaCl, %)	Температура, °C	
Спорышевское	pH 5	0,5	23-25	87,07
	pH 7	0,5	23-25	91,46
	pH 8,5	0,5	23-25	68,7
	pH 7	5,0	23-25	75,7
	pH 7	7,0	23-25	70,0
	pH 7	0,5	4-6	76,06
Усинское	pH 7	0,5	4-6	62,4
	pH 7	0,5	23-25	90,9

В табл. 4. продемонстрировано, что в разных условиях эксперимента (добавление в питательную среду соли, изменение pH, температуры, нефть из разных месторождений) утилизация н-алканов ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* B 1024 оставалась высокой и составляла от 62 до 91%.

Проведенные эксперименты показали, что утилизация компонентов нефти происходит с большей эффективностью в опытах с ассоциацией штаммов, чем с внесением монокультур. Так, степень деструкции н-алканов Спорышевской нефти ассоциацией, включающей в свой состав штаммы Y 1064 и B 1024, при pH 7.0 достигала 91 % за 6 суток, в отличие от использования монокультуры штамма *Yarrowia lipolytica* Y 1064, где степень деструкции была равной 69 %. Наибольший процент деструкции нефти ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* B 1024 был достигнут при значении pH 7, концентрации NaCl 0,5% и температуре 23-25°C (табл. 4, рис. 3).

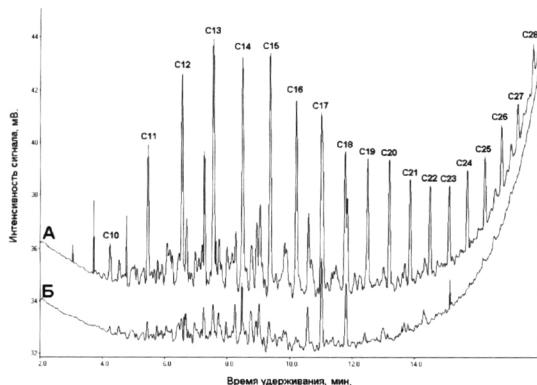


Рис. 3. Газовая хроматограмма хлороформного экстракта Спорышевской нефти без добавления деструкторов (А) и после биодеструкции ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter* sp. В 1024 (Б) в течение 6 суток инкубирования при температуре 23°C и pH среды 7.0.

Высев содержимого емкостей с нефтью и микроорганизмами во время культивирования и после биодегradации нефти на агаризованные среды 8Е и РПА показал, что количество выросших колоний соответствует соотношению 1:1, что говорит о стабильности полученной ассоциации штаммов.

В исходной нефти гомологический ряд н-алканов был представлен углеводородами от C₁₀ до C₃₈ (рис. 4).

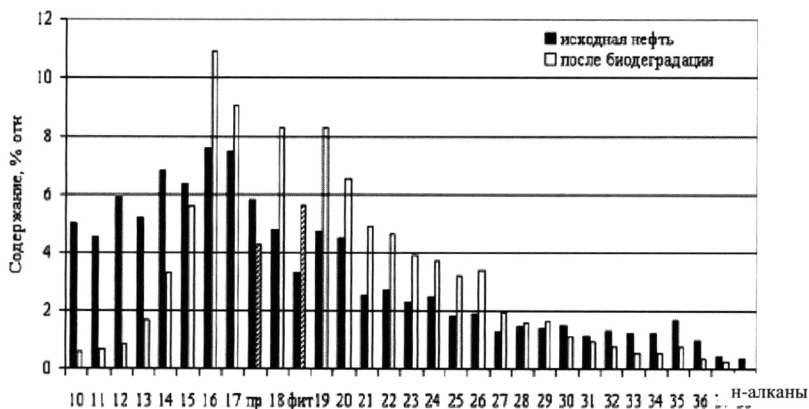


Рис. 4. Молекулярно-массовое распределение насыщенных углеводородов нефти Лас-Еганского месторождения после биодегradации ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter* sp. В 1024 после 7 суток культивирования при температуре 23 – 25 °С. Обозначения: пр – пристан, фит – фитан.

Как видно из молекулярно-массового распределения насыщенных углеводородов на рис. 4, после биodeградации ассоциаций штаммов в течение 7 сут при температуре 23 - 25°C определялись легкие и средние углеводороды от C₁₀ до C₃₈. Относительное содержание н-алканов н-C₁₀-н-C₁₈ уменьшилось в 3-7 раз; значительно возросла доля изоалканов C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₈. Количество остаточной нефти после биodeградации нормировано на остаточные углеводороды.

Среди нефтеутилизирующих штаммов из реки Ельцовки-1 наибольшую биозумлигирующую и нефтеокисляющую активность проявили неспоронные бактерии, идентифицированные впоследствии как *Acinetobacter junii* El 133, *Acinetobacter calcoaceticus* El 134, *Acinetobacter calcoaceticus* El 135. Представители рода *Acinetobacter* являются типичными обитателями водных экосистем, обладают устойчивостью к неблагоприятным факторам среды, в т.ч. к таким загрязнителям, как тяжелые металлы, являются деструкторами нефтепродуктов, вследствие чего перспективны для использования в целях биоремедиации. Штаммы рода *Acinetobacter* были выделены также из воды и донных отложений рек Чика, Власихи, почвы береговой зоны реки Катунь.

Методом газовой хроматографии было установлено, что выделенные из Ельцовки-1 штаммы рода *Acinetobacter* являются высокоэффективными утилизаторами н-алканов (табл. 5).

Таблица 5. Степень утилизации углеводородов нефти штаммами *Acinetobacter junii* El 133, *Acinetobacter calcoaceticus* El 134, *Acinetobacter calcoaceticus* El 135 после 7 суток культивирования при температуре 23 – 25 °C

Углеводород	Кол-во атомов углерода	Утилизация углеводородов нефти (%)		
		El 133	El 134	El 135
н-Додекан	C12	71	89	88
н-Тридекан	C13	93	97	92
н-Тетрадекан	C14	97	97	98
н-Пентадекан	C15	94	93	98
н-Гексадекан	C16	99	99	99
н-Гептадекан	C17	89	97	99
н-Октадекан	C18	98	97	97
н-Нанодекан	C19	99	98	96
н-Эйкозан	C20	96	97	99
н-Генэйкозан	C21	96	98	98
н-Докозан	C22	93	96	93
н-Трикозан	C23	99	97	98
н-Тетракозан	C24	97	97	97
н-Пентакозан	C25	91	96	98
н-Гексакозан	C26	88	92	96
н-Гептакозан	C27	87	94	97
н-Октакозан	C28	78	95	98

н-Нанокозан	C29	90	98	98
н-Триконтан	C30	94	97	95
н-Гентриконтан	C31	75	90	91
н-Дотриконтан	C32	91	87	98
н-Тритриконтан	C33	93	93	99
Среднее значение по найденным углеводородам		91	95	97

Было показано, что степень деструкции различных н-алканов штаммами рода *Acinetobacter* El 133, El 134, El 135 составляла от 91 до 97 % за 7 суток культивирования.

Оценка деструкции ароматических углеводородов микроорганизмами

Ароматические углеводороды в исходной нефти были представлены гомологами бензола с молекулярными массами 92, 106, 120; алкилнафталинами с массами 128, 142, 156, 170, 184; триаренами с массами 178, 192, 206 и дибензтиофенами с массами 184 и 198. После биодеградации ассоциацией культур *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter* sp. В 1024 значительно снизилась доля алкилбензолов и алкилнафталинов (табл. 6).

Таблица 6. Состав ароматических углеводородов и дибензтиофенов в исходной нефти и после ее биодеградации ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter* sp. В 1024

Масса иона, название соединения	Содержание, % отн.	
	Исходная нефть	Остаточная после биодеградации
92 толуол	3.32	7.85
106 диметилбензолы, этилбензол	11.06	1.02
120 триметилбензолы, метилэтилбензолы	14.16	0.41
128 нафталин	2.87	0.04
142 метилнафталины	12.23	0
156 диметилнафталины, этилнафталины	26.08	0.33
170 триметилнафталины, метил этилнафталины	23.48	4.11
184 тетраметилнафталины, диэтилнафталины	5.83	1.97
178 фенантрен	0.16	22.25
192 метилфенантрены	0.53	41.53
206 диметилфенантрены	0.30	20.50
184 дибензтиофен	1.76	0.49
198 метилдибензтиофен	2.91	1.78

Наиболее токсичными среди ароматических соединений нефти являются, как известно, моно- и диароматические углеводороды, причем в ряду бензолов, нафталинов и фенантронов токсичность увеличивается с увеличением степени алкилирования.

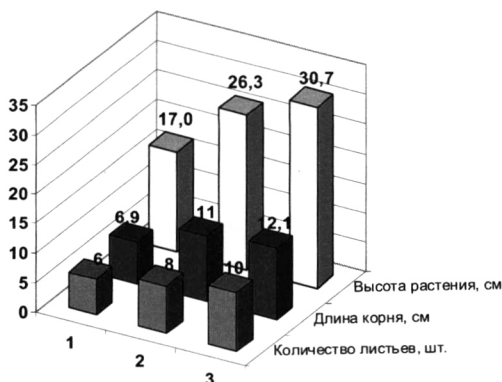
Как видно из табл. 6, содержание диметилбензолов и этилбензолов снизилось в 10,8 раз, триметилбензолов и метилэтилбензолов в 34,5 раза, метилнафталинов в 12,3 раза, диметилнафталинов и этилнафталинов в 79 раз, триметилнафталинов и метилэтилнафталинов в 5,71 раза. Увеличилось относительное содержание углеводов ряда фенантрена, уменьшилось содержание дибензтиофена - в 3,6 раза, и метилдибензтиофена – в 1,63 раза. Увеличение содержания углеводов ряда фенантрена – относительное (за счет утилизации ароматических углеводов с меньшей молекулярной массой).

Проведены опыты, позволяющие оценить степень деструкции ароматических углеводов ассоциацией штаммов микроорганизмов и монокультурой. Выяснено, что утилизация ароматических углеводов происходит более интенсивно в образце с ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* B 1024 (уменьшение площадей пиков в 2,14 раза по сравнению с контролем), чем с добавлением одного штамма Y 1064 (уменьшение площадей пиков в 1,44 раза по сравнению с контролем) за 20 суток культивирования. Т.е. ассоциация штаммов Y 1064 и B 1024 утилизировала ароматические углеводороды в 1,5 раза эффективнее монокультуры штамма Y 1064.

Таким образом, исследованные микроорганизмы обладали способностью эффективно окислять широкий спектр компонентов нефтепродуктов. Проведенные эксперименты по утилизации n-алканов и ароматических углеводов штаммами микроорганизмов показали преимущество использования бактериально-дрожжевой ассоциации над монокультурой дрожжей.

Оценка роста и развития растений в очищенной биодеструкторами почве

В результате исследования в природных условиях выяснено, что выбранные биодеструкторы способствовали очищению почвы от нефти. Экспериментальные растения чувствительных к нефти видов (огурец, горох) и устойчивых (пырей ползучий), выросшие в почве, очищенной биодеструкторами, были сравнимы с контрольными растениями, выросшими в чистой почве без нефти, по рассмотренным показателям (высота растений, количество листьев, длина корня) (рис. 5).



Обозначения:

- 1 – в почве, загрязненной нефтью;
- 2 – в почве, загрязненной нефтью и очищенной ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter* sp. B 1024;
- 3 – в контрольной почве, не содержащей нефти.

Рис. 5. Параметры роста растений пырея, выращенных в различных вариантах опыта.

Так, например, для пырея средняя высота растений в контрольном варианте составила 30,7 см, в варианте с очищенной биодеструкторами почвой – 26,3 см, в варианте с загрязненной почвой без биодеструктора – 17 см (рис. 5).

Сочетание методов интродукции биодеструкторов и внесения сорбента

Для большей эффективности процесса биоремедиации является целесообразным сочетание методов интродукции микроорганизмов и использования природных сорбентов. На данный момент оптимальным в условиях северных регионов является применение сорбента «Сорбонафт», основой которого служит верховой торф месторождения Кировской области (производитель ЗАО «Пресс-Торф»). Преимуществами сорбента «Сорбонафт» являются возможность многократного применения, высокая нефтеемкость и плавучесть. Полевые испытания сорбента «Сорбонафт» были проведены летом 2005 года в Усинском районе республики Коми на нефтяном разливе двухнедельной давности на малых водотоках.

В опытных экспериментах было выяснено, что нефть, адсорбированная частицами гидрофобного торфа, доступна исследованным микроорганизмам только частично (с поверхности). Таким образом, сорбент, впитавший нефть, снижает ее доступность для внесенных микроорганизмов-деструкторов. Поэтому целесообразным является применение сорбента и внесение предложенных биодеструкторов последовательно. При этом внесенный сорбент снижает токсичность

нефти связывая ее. С водной поверхности удаляется пленка, что способствует аэрации, нормальному функционированию экосистемы, и позволяет аэробной микробиоте постепенно окислять компоненты нефтепродуктов.

Опытным путем было установлено, что, в случае очистки водной поверхности от нефтезагрязнения, эффективным является внесение сорбента с последующим его сбором. В случае же очистки грунта предпочтительнее в качестве утилизаторов нефти использовать микроорганизмы-деструкторы.

Предложенные бактериальные и дрожжевые микроорганизмы, являющиеся эффективными деструкторами нефти, могут быть использованы для биоремедиации загрязненных нефтепродуктами и минерализованными пластовыми водами почв, водных и промышленных объектов в условиях пониженных температур.

ВЫВОДЫ

1. Из природных биоценозов Сибири выделены 424 штамма психротолерантных и галотолерантных микроорганизмов-деструкторов, способных к деструкции нефти и нефтепродуктов в климатических условиях северных регионов с перспективой их использования в целях биоремедиации.
2. Наибольшее количество выделенных микроорганизмов-нефедеструкторов относилось к бактериям родов *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Enterobacter*, к грибам родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Yarrowia* и др. Эффективные штаммы-деструкторы нефтепродуктов были идентифицированы как *Yarrowia lipolytica*, *Enterobacter sp.*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter calcoaceticus*.
3. Оценена степень деструкции н-алканов и ароматических углеводов штаммами-деструкторами. Содержание н-алканов после биodeградации штаммами *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter calcoaceticus* снизилось до 97%, ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* B 1024 - до 92%. Содержание производных бензола после биodeградации ассоциацией штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* B 1024 снизилось до 34,5 раз; производных нафталина - до 79 раз.

4. Утилизация ароматических углеводородов нефти в ассоциации штаммов *Yarrowia lipolytica* Y 1064 и *Enterobacter sp.* В 1024 происходит в 1,5 раза эффективнее по сравнению с использованием одного штамма *Yarrowia lipolytica* Y 1064.
5. Интродукция биодеструкторов *Yarrowia lipolytica* Y 1064, *Enterobacter sp.* В 1024, *Acinetobacter junii* EI 133, *Acinetobacter calcoaceticus* EI 134, *Acinetobacter calcoaceticus* EI 135 в загрязненные субстраты способствовала их очищению от нефти.
6. Результаты испытаний наиболее эффективных деструкторов в вегетационных опытах по очищению почвы от загрязнения нефтью показали, что растения пырея по своим характеристикам роста и развития в 1,5 раза превышали аналогичные показатели для растений из загрязненной почвы и незначительно отличались от растений в почве без загрязнения.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи:

1. Emelyanova E., Andreeva I., Zagrebelny S. Repin V. Psychrotolerant oil-degrading microorganisms for bioremediation // **Environ. Eng. Manag. J.** – 2006. - V.5. - No.2. – P. 169-179.
2. Андреева И.С., Емельянова Е.К., Загребельный С.Н., Олькин С.Е., Резникова И.К., Репин В.Е.. Психротолерантные штаммы-нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды // **Биотехнология.** – 2006. - №1. - С. 43-52.
3. Andreeva I.S., Emel'yanova E.K., Ol'kin S.E., Reznikova I.K., Zagrebel'nyi S.N., Repin V.E. Consumption of Hydrocarbons by Psychrotolerant Degradator Strains // **Appl. Biochem. Microbiol.** – 2007. - V. 43. - No. 2. P. 201–206.

Патенты на изобретение:

4. Андреева И.С., Емельянова Е.К., Олькин С.Е., Резникова И.К., Загребельный С.Н., Репин В.Е. Штаммы микроорганизмов-деструкторов *Saccharomyces sp.* и *Pseudomonas sp.*, используемые для биоремедиации нефтезагрязненных объектов окружающей среды, и ассоциация на их основе // **Патент на изобретение** № 2272071. Заявка 2004107206/13 от 10.03.2004. Патентообладатель ГНЦ ВБ «Вектор».
5. Андреева И.С., Емельянова Е.К., Репин В.Е. Штамм *Alcaligenes sp.* EI 135 для биоремедиации нефтезагрязненных объектов окружающей среды // **Патент на изобретение** № 2271390. Заявка № 2004124964/13 от 16.08.04. Патентообладатель ГНЦ ВБ «Вектор».

Тезисы:

6. Загребельный С.Н., Андреева И.С., Емельянова Е.К., Пучкова Л.И. Экология природных микробных сообществ водных экосистем // Мат. межрегионального рабочего совещания «Проблемы биоремедиации в XXI веке». – Красноярск. – 2002. - С. 73-74.
7. Емельянова Е. К. Микроорганизмы-биодеструкторы для биоремедиации почв и водной среды, загрязненных нефтепродуктами // Мат. XLI Международной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”. НГУ. – 2003. - С. 66-67.
8. Емельянова Е.К., Андреева И.С., Загребельный С.Н. Исследование разнообразия микроорганизмов, адаптированных к сибирским природным условиям для биоремедиации “местных” нефтезагрязненных почв и водных объектов // Мат. Международного междисциплинарного Конгресса “Прогрессивные научные технологии для здоровья человека”. Кара-Даг, Феодосия, Украина, 2003. - С. 69-70.
9. Андреева И.С., Емельянова Е.К., Загребельный С.Н., Репин В.Е. Ассоциации микроорганизмов, адаптированные к условиям Западной Сибири для биодegradации нефтезагрязнений почвы и водной среды // Материалы Международной научно-практической конференции “Современные проблемы геохимической экологии и сохранения биоразнообразия”, Бишкек, Киргизия, 2003.- С. 60-63.
10. Andreeva I.S., Emelyanova E.K., Repin V.E., Zagrebelsky S.N. The Investigation of the ability of microbial communities from the lake ecosystems to degrade the oil components // IBISM-2003, Irkutsk-Russia, September 8-13, 2003. - P. 5-6.
11. Emel'yanova E., Andreeva I., Zagrebelsky S., Repin V. Bioremediation of oil-polluted soils of Western Siberia with psychrotolerant acid-resistant destructing microorganisms. // Innovate roles of biological resource centers. Proceedings of the tenth International Congress for Culture Collections Tsukuba, Japan, 10-15 October, 2004. - P. 652.
12. Емельянова Е.К., Андреева И.С., Репин В.Е. Загрязненные экосистемы малых рек в черте города Новосибирска – источник активных микроорганизмов-нефтидеструкторов // Материалы 6-ого Международного Конгресса «Экватэк-2004», Москва, 1-4 июня 2004 г. - С. 317.
13. Емельянова Е.К., Андреева И.С., Репин В.Е. Микроорганизмы-нефтидеструкторы из загрязненных экосистем малых рек // Мат. 3-ей Всероссийской научно-практической конференции «Добыча, подготовка, транспорт нефти и газа», Томск, 20-24 сентября 2004 г. - С. 60-63.
14. Емельянова Е.К., Андреева И.С., Репин В.Е. Бактериальное загрязнение малых городских рек и их способность к самоочищению от нефтепродуктов // Мат. межрегиональной научно-практической конференции «Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование», 27-28 октября 2004 г. Иркутск, 2004. - ИГУ, 2004. - С. 134 -138.
15. Емельянова Е.К., Андреева И.С., Торок Т., Репин В.Е. Проблема загрязнения малых рек. Микробиологический анализ урбанизированной реки Ельцовки-1 в Новосибирске. //

- Мат. конф. «Фундаментальные проблемы изучения и использования воды и водных ресурсов», 20-24 сентября 2005г., Иркутск, 2005. - С. 240-242.
16. Емельянова Е.К., Андреева И.С., Репин В.Е. Применение микроорганизмов, выделенных в загрязненных биотопах, в качестве биодеструкторов нефтепродуктов // Мат. Международной конференции «Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды», 14-16 сентября 2005 г, Саратов. - С. 70.
17. Andreeva I.S., Svarovskaya L.I., Emelyanova E.K., Zagrebelny S.N., Repin V.E. Oxygenase activity of pure cultures of yeasts, bacteria of Arthrobacter genus and their association in the process of biodegradation of the oil of the Las-Egan oilfield //Abstracts 2nd International Conference "SCIENCE-BUSINESS-EDUCATION", Pushchino. – 2005. - P. 122-123.
18. Емельянова Е.К., Пучкова Л.И., Андреева И.С., Репин В.Е. Плазмидосодержащий штамм-нефтедеструктор, выделенный из реки Катунь // Мат. 2-го Байкальского Микробиологического Симпозиума «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ», 10-15 сентября 2007 г., Иркутск, 2007. - С. 75-76.

Благодарности

Автор признателен сотрудникам, способствовавшим выполнению данной работы: н.с. Н. И. Печуркиной, к.б.н. Л. И. Пучковой, зав. химико-аналитической лабораторией С. Е. Олькину, н.с. И. К. Резниковой, д.б.н., проф. Т. В. Тепляковой, к.б.н. А. Ю. Алексееву, к.б.н. Л. И. Сваровской, к.х.н. С. В. Морозову, зав. лабораторией «Коллекция вирусов бактерий, плазмид, генетических конструкций и некультивируемых микроорганизмов» В. Г. Пугачеву, Г. М. Тулянкину, к.б.н. Т. И. Лобовой, н.с. С. А. Киселеву, д.б.н. Е. В. Дейнеко.

Особую благодарность автор приносит своим руководителям и учителям к.б.н. В. Е. Репину, зав. лабораторией бактериальных и архейных культур И. С. Андреевой, д.б.н., проф. С. Н. Загребельному.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 01-05-64615), МНТЦ (проекты 2490, 2216).

Емельянова Елена Константиновна

**МИКРООРГАНИЗМЫ ПРИРОДНЫХ БИОЦЕНОЗОВ ДЛЯ
БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ И ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ СИБИРИ,
ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ**

Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Подписано в печать 30.01.2009. Заказ № 82.

Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз.

Типография Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН

10=